



Kandidaatintutkielma

Rintasyövän kantasolut

Katariina Kankaanpää

Oulun yliopisto
Biokemian ja molekyyli lääketieteen tiedekunta
2020

Sisällysluettelo

Käytetyt lyhenteet

1. Rintasyöpä	4
2. Kantasolut	5
2.1 <i>Syövän kantasolut</i>	5
2.2 <i>Rintasyövän kantasolut</i>	6
3. BCSCs biomarkerit	8
3.1 <i>CD44</i>	8
3.2 <i>CD24</i>	10
3.3 <i>ALDH1</i>	11
4. BCSCs signalointi	12
4.1 <i>Notch</i>	13
4.2 <i>Hedgehog</i>	14
4.3 <i>Wnt</i>	15
4.4 <i>Hippo</i>	17
4.5 <i>JAK/STAT</i>	18
5. MikroRNA:n rooli rintasyövässä	20
6. Rintasyövän terapia ja terapiaresistanssi.....	22
7. Kirjallisuusviitteet	25

Käytetyt lyhenteet

CSC	syövän kantasolut
ER	estrogeenireseptori
PR	progesteronireseptori
HER-2	HER-kasvutekijä
BCSC	rintasyövän kantasolut
CD44	cluster of differentiation 44
CD24	cluster of differentiation 24
ALDH1	aldehyde dehydrogenase 1
HA	hyaluronaatti
CD44v	variantti CD44
CD44s	kanoninen CD44
HSC	hematopoieettiset kantasolut
NECD	notch extracellular domain
TM	transmembrane domain
NICD	notch intracellular domain
Hh	Hedgehog
Shh	Sonic hedgehog ligand
Ihh	Indian hedgehog ligand
Dhh	Desert hedgehog ligand
YAP	Yes-associated protein
JAK/STAT	Janus kinase/signal transducers and activators of transcription pathway
miRNAs	MikroRNA
IGF-1	insulin-like growth factor
LTL	lysothermosensitive liposomal doxorubicin

1. Rintasyöpä

Syöpä muodostuu, kun solu muuntuu niin, ettei se enää tottele normaalia kasvua sääteleviä signaaleja, tämän seurauksena kontrollitta kasvava solukko muodostaa kasvaimen, jolla on oma verisuonitus ja joka pystyy tunkeutumaan ympäröivään kudokseen. Syöpä on ollut tärkeimpiä tutkimuskohteita koko solubiologian tieteenalan olemassaolon ajan (Heino, Vuento 2015). Rintasyöpä on maailmanlaajuisesti yksi yleisimmistä kuolinsyistä naisilla, Yhdysvalloissa diagnosoidaan vuosittain noin 260 000 uutta tapausta ja yli 40 000 rintasyövän aiheuttamaa kuolemaa (Crabtree, Miele 2018). Suomessa rintasyöpä on naisten yleisin syöpätyyppi, vuonna 2017 rintasyöpään sairastui Suomessa 4960 naista ja siihen menehtyi 923 (Suomen Syöpärekisteri, 2017).

Rintasyövän taustalla on heterogeeninen ryhmä geneettisiä muutoksia, joiden ansiosta eri potilaiden tuumorit reagoivat eri tavalla terapiaan. Jotta potilaiden parantumisennustetta voitaisiin parantaa, täytyy tarkasti erotella rintasyövän alaryhmät, joilla on huono ennuste. Biologisten markkereiden avulla voidaan arvioida rintasyöpäpotilaiden ennustetta, tällaisia markkereita ovat estrogeenireseptori (*estrogen receptor*, ER), progesteronireseptori (*progesterone receptor*, PR) sekä HER-kasvutekijä (*human epidermal growth factor receptor-2*, HER-2) Nämä markerit ovat kasvutekijäreseptoreita, joiden signaalireitit ovat tärkeitä solun kasvunsäätelyssä, niiden mutaatiot myös mahdollistavat riippumattomuuden kasvutekijöistä (Liu, Liu et al. 2008). Rintasyöpä voi olla luminaalista A-tyyppiä, jolloin ER ja/tai PR ilmentyvät, eli puhutaan, että syöpä on ER ja/tai PR-positiivinen, jakautuminen on vähäistä ja HER-2 on negatiivinen. Luminaalisessa B-tyypissä ER ja/tai PR on positiivinen, mutta jakautuminen on nopeampaa ja ärhäkkäämpää kuin A-tyypissä. HER-2 positiiviseksi rintasyöväksi kutsutaan sellaisia rintasyöpiä, joista löytyy HER-2 -onkogeenin monistuma, tämä lisää syövän aggressiivisuutta ja uusiutumisriskiä. Intraduktaalinen rintasyöpä (DCIS) tarkoittaa syövän esiasetetta, varsinaista eli ns. invasiivisista rintasyöivistä tavallisimmat alatyypit ovat duktaalinen ja lobulaarinen. (Duodecim 2017)

Yleisin rintasyövän oire on kyhmy rinnassa, kyhmy on useimmiten kivuton, mutta se voi myös aiheuttaa kipua, pistelyä tai ihomuutoksia, joskus kyhmy voi esiintyä myös kainalossa. Rintasyöpä voidaan todeta mammografiassa eli rinnan röntgenkuvauksessa, valtaosa rintasyöivistä kuitenkin todetaan siten, että nainen on itse havainnut rinnassaan muutoksia ja hakeutunut tutkimuksiin. Kaikki rinnasta löytyvät kyhmyt eivät ole pahanlaatuisia, vaan ne voivat olla hyvänlaatuisia muutoksia, kystia eli nesterakkuloita tai fibroadenoomia eli sidekudoskasvaimia. (Duodecim 2017)

Rintasyöpä on monitekijäinen sairaus, joten monet asiat voivat vaikuttaa diagnoosin saamiseen. Osa rintasyöivistä johtuu perinnöllisestä syöpäalttiudesta, periytyvästä geenimuunnoksesta, tavallisimpia näistä ovat ns. BRCA-1 (*breast cancer 1 gene*) tai BRCA-2 (*breast cancer 2 gene*) -geenimutaatiot.

BRCA-1 ja BRCA-2 ovat suuria proteiineja, jotka vaikuttavat monien muiden proteiinien kanssa, jotka osallistuvat mm. transkriptioon, DNA korjaukseen ja solusyklin kontrolloimiseen. (Nelson, Cox 2017)

2. Kantasolut

Ihmisen kaikki solut ovat saaneet alkunsa totipotentista hedelmöittyneestä munasolusta, blastokystivaiheessa eli alkion kehittyessä syntyy kolme solukerrosta: endodermi, ektodermi sekä mesodermi. Endodermin soluista muodostuu ruoansulatuskanavan, hengitysteiden ja keuhkojen epiteelisolut; ektodermin soluista muodostuvat hermosolut sekä ihon epiteelisolut, mesodermin solut puolestaan muodostavat mm. sidekudoksen, veren ja lihasten solut. Solut, jotka pystyvät erilaistumaan kaikkien kolmen alkiokerroksen soluiksi, sanotaan pluripotentteiksi kantasoluiksi. Nämä erilaistumattomat solut pystyvät jakaantumaan rajattomasti, ja synnyttämään tytärsoluistaan soluklooneja. Jatkuva jakaantuminen on mahdollista pluripotentteille kantasoluille ominaisen telomeraasiaktiivisuuden ansiosta. (Heino, Vuento 2015)

Pluripotentteja soluja esiintyy kolmea tyyppiä: blastokystistä eristettyjä alkion kantasoluja (*embryonic stem cells*, ES-solut), 5-9 viikkoa vanhoista sikiöistä eristettyjä itusoluja (*embryonic germ cells*, EG-solut) sekä ECC-soluja (*embryonic carcinoma cells*), jotka ovat kantasoluista muodostuneita syöpäsoluja ja ne muodostavat kasvaimia, joissa on eri tavalla erilaistuneita soluja. Aikuisiltakin löytyy kantasoluja (*adult stem cells*), näiden kyky erilaistua on rajoitettu sen kudoksen soluihin, mistä ne on eristetty. Parhaiten tunnetaan aikuisen luuytimen kantasolut, joiden siirtoa käytetään lääketieteellisenä toimenpiteenä. (Heino, Vuento 2015)

Kantasolujen jakaantuminen voi olla symmetristä tai epäsymmetristä, symmetrisessä jakautumisessa molemmat tytärsolut ovat samanlaisia ja epäsymmetrisessä jakautumisessa vain toinen tytärsolu jatkaa kantasoluna toisen muodostaessa lähtökohdan seuraavien jakautumiskertojen myötä tapahtuvalle asteittaiselle erilaistumiselle. Kantasolujen käyttö lääketieteessä antaisi paljon mahdollisuuksia, mutta niiden käyttöön liittyy paljon kiistanalaisia eettisiä kysymyksiä. (Heino, Vuento 2015)

2.1 Syövän kantasolut

Syöpätutkijat ovat selvittäneet, että yksinäisen syöpäkasvaimen soluista vain pieni osa pystyy synnyttämään uuden kasvaimen, kasvainta ylläpitää pieni joukko soluja, jotka pystyvät tuottamaan itsensä kaltaisia tytärsoluja. Syövän kantasolut (CSCs) saattavat syntyä kudosten normaaleista

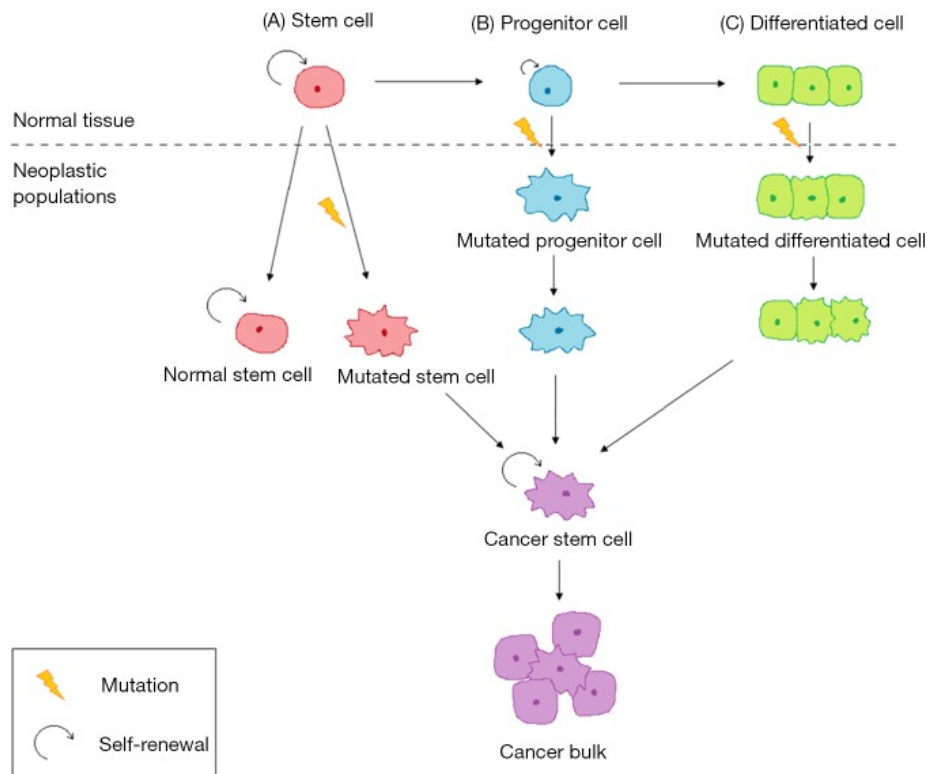
kantasoluista, toisen teorian mukaan ne kehittyvät erilaistumisen aloittaneista soluista mutaatioiden seurauksena. (Heino, Vuento 2015; Yu, Pestell et al. 2012)

CSC:t pystyvät vastustamaan monia syöpähoitoja, kuten kemoterapiaa (*chemotherapy*) eli sytostaattihoidoja sekä sädehoitoa (*radiation therapy*) eli hoitoa, jossa käytetään hyväksi ionisoivaa säteilyä. Tämä johtuu niiden kyvystä itseuudistua sekä erilaistua heterogeenisiksi syöpäsoluiksi. Tämä teoria ehdottaa, että monissa syöpähoidoissa epäonnistutaan siksi, koska tapettaessa kasvainsolut, ei eliminoida syövän kantasoluja, jotka selviävät ja voivat muodostaa uusia tuumoreita. (Gupta, Onder et al. 2009)

Syövän kantasoluja ei pystytä vielä varmuudella tunnistamaan kudoksissa, joten vielä ei pystytä määrittämään CSC alapopulaatioiden osuutta kasvaimessa, niiden merkitystä kliiniseen lopputulokseen tai niiden alkuperää. Aiemmin uskottiin CSC:n muodostavan pienen osan kasvaimen solupopulaatiosta, kuitenkin väitetään, että jopa 25 %:lla syöpäsoluista on CSC ominaisuuksia. (Yu, Pestell et al. 2012; Kelly, Dakic et al. 2007) Tällä hetkellä syövän kantasolut ovatkin tärkeä tutkimuksen kohde, koska potilaiden parantumisprosentin edistämiseksi on tärkeää kehittää uusia strategioita CSCs vastaan, jotta voitaisiin tehokkaasti hävittää pitkälle kehittynyt syöpä ja estää etäpesäkkeiden muodostumista (Gener, Montero et al. 2020).

2.2 Rintasyövän kantasolut

Rintasyövässä esiintyy pieniä solupopulaatioita, jotka on nimetty rintasyövän kantasoluiksi (*breast cancer stem cells*, BCSCs), nämä solut liitetään kasvaimen syntyyn ja kehitykseen, etäpesäkkeiden kehitykseen, syövän uusiutumiseen sekä syöpäkasvaimen terapiaresistanssiin, BCSCs muodostuminen esitetään kuvassa 1. (Crabtree, Miele 2018)



Kuva 1. Rintasyövän kantasolujen (BCSC) muodostumismallit. A) BCSC:t muodostuvat rintarauhasen kantasoluista, useat tehokkaat mutaatiot aiheuttavat kantasolujen onkogeenisin muutoksen. B) BCSC:t muodostuvat esisolusta (progenitor cell), jotka ovat kantasoluja hieman pidemmälle erikoistuneita soluja, joilla on edelleen kyky erikoistua useaan eri tehtävään. Useiden mutaatioiden tapahtuminen esisolulle johtaa transformaatioon ja aloittaa pahanlaatuisuuden. C) BCSC:t muodostuvat erilaistuneista rintarauhasen soluista, erilaistuneille soluille palautetaan kantasolun ominaisuudet. Kuvan lähde (Sin, Lim 2017).

Näiden solujen alkuperä pysyy kiistanalaisena johtuen kasvaimen heterogeenisyydestä, niiden toimintaa voidaan kuitenkin arvioida rintaepiteelisolujen pesäkkeen muodostamiskyky kokeella (*mammosphere formation assay*) (Crabtree, Miele 2018; Lombardo, de Giorgio et al. 2015). Näissä määrittelyissä BCSC:t stimuloidaan lisäämällä EGF-kasvutekijää (*epidermal growth factor*,) ja bFGF-kasvutekijää (*basic fibroblast growth factor*) elatusaineeseen (*culture media*) kudosisviljelymaljoille. Tämän kokeen avulla BCSC:t lisääntyvät nopeasti synnyttäen rintarauhasen soluja (*mammospheres*), jotka omaavat monia kantasolujen ominaisuuksia, kuten kantasoluihin liittyvien signaalointireittien aktivointi. Näiden rintarauhasen solujen muodostuminen korreloi hyvin kudosten tuumorigeenisyyden kanssa, kudos on tuumorigeeninen silloin, kun se on läpikäynyt mutaatioita ja pystyy muodostamaan kasvaimia. Tästä johtuen solujen, jotka muodostavat rintarauhasen soluja, uskotaan heijastavan BCSCs määrää, kun taas rintarauhasen solujen koon uskotaan heijastavan proliferatiivista aktiivisuutta (Lombardo, de Giorgio et al. 2015).

Nykyisin tutkitaan paljon solujen biomarkkereita ja niiden korrelaatiota rintasyövän kantasoluihin, yleisimpiä näistä biomarkkereista ovat CD44, CD24 sekä ALDH1 (Crabtree, Miele 2018).

3. BCSCs biomarkkerit

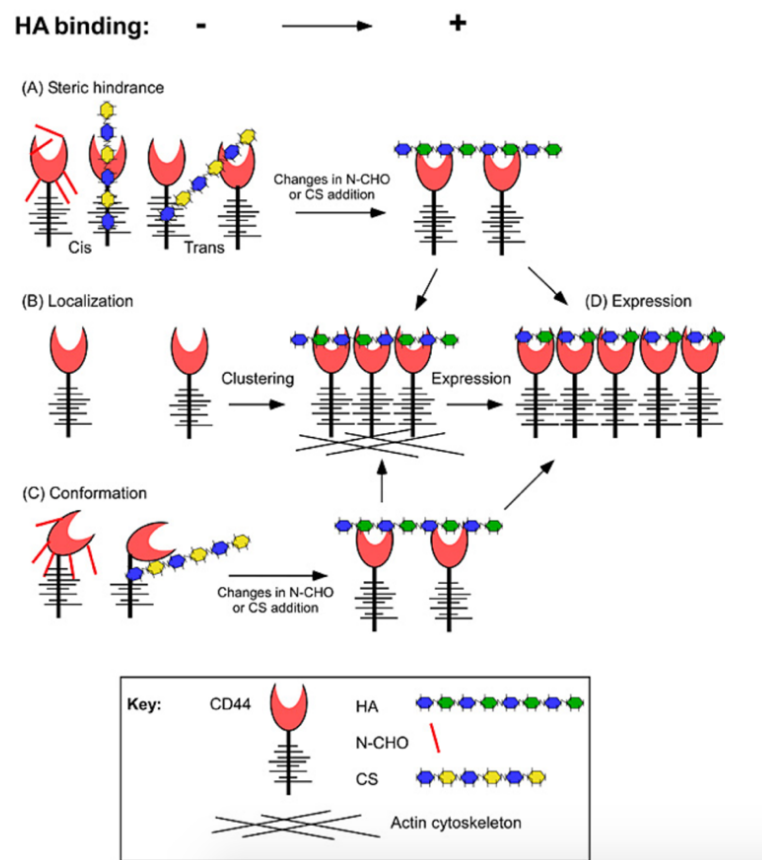
Rintasyövän kantasolujen tunnistamiseen käytetään erilaisia biomarkkereita, näiden markkereiden läsnäoloon liitetään usein myös kemoterapian ja sädehoitojen vastustuskyky. Kohdennettuja hoitoja näitä BCSC-fenotyypejä vastaan kehitellään kaiken aikaa, on ehdotettu joukko vasta-aineita, jotka kohdistuvat näihin biomarkkereihin BCSCs eliminoimiseksi. Tiedetään, että kolmoisnegatiivisessa rintasyövässä näiden biomarkkerien pitoisuudet ovat suurempia kuin muissa rintasyöpätyypeissä. Rintasyövällä on myös muita markkereita, mutta tässä tutkielmassa keskitytään niistä kolmeen yleisimpään, CD44, CD24 sekä ALDH1. (Crabtree, Miele 2018)

3.1 CD44

Cluster of differentiation 44 (CD44) on solukalvon molekyyli sekä glykoproteiini, eli siihen on liittynyt ainakin yksi hiilihydraattiryhmä, CD44 havaittiin ensin lymfosyyteissä, mutta myöhempien tutkimusten myötä sitä havaittiin löytyvän useimmista ihmisen kudoksista, kuten keskushermostosta, keuhkoista, orvaskedeltä, maksasta sekä haimasta. Suurin osa CD44 molekyylistä sijaitsee solun ulkopuolella, molekyylin C-terminaali eli karboksyylipää sijaitsee solun sisällä ja muodostaa osan molekyylin sytoplasmisesta domeenista. Solun ulkopuolella sijaitseva osa koostuu keskimmäisestä domeenista (*variable/middle domain*) sekä aminoterminalisesta domeenista (*aminoterminal hyaluronan binding domain*), joka sitoo hyaluronihappoa. Keskimmäisessä domeenissa eri isoformit ilmentävät tyypillistä proteiinivarianttiaan. Sytoplasmisen domeenin toimii solun sisäisen tukirangan kanssa, sekä on vastuussa CD44 kuljettamisesta tiettyihin solun osiin, sekä voi myös lisätä molekyylin ikää. N-terminaali on vastuussa myös CD44 molekyylin tärkeimmän ligandin, hyaluronaanin sitoutumisesta. (Sneath, Mangham 1998)

CD44 molekyyllillä on monia fysiologisia tehtäviä soluissa, se toimii mm. solun liikkumisessa, hyaluronaatin hajoamisessa, lymfosyyttien aktivoinnissa, sytokiinin vapautuksessa sekä imusolmukkeiden itseohjautuvuudessa. Lisäksi sillä on rooli myelo- sekä lymfopoieesissa ja angiogeneesissä. CD44 tehtävät ovat yleensä riippuvaisia solujen adheesiosta eli prosessista missä solu kiinnittyy viereiseen soluun, adheesio johtaa solu-solu tai solu-väliaine -vuorovaikutukseen. CD44:lla esiintyy monia ligandeja; hyaluronaani, kondroitiini, kollageeni, laminiini ja fibronktiini, tärkein näistä on kuitenkin hyaluronaani, joka koostuu kahdesta positiivisesti varautuneesta aminohappoja sisältävästä klusterista. Hyaluronaani on pitkä, suuren molekyylipainon omaava

polysakkaridi. Solun sitoutuminen hyaluronaattiin CD44 kautta on hyvin tarkoin säädelty tapahtuma ja se on esitetty kuvassa 2. CD44 eri isoformit pystyvät sitomaan hyaluronaattia eri voimakkuuksilla. Variantti CD44 (engl. *variant CD44*, CD44v) sisältää yhden tai monta varianttia sekä hyaluronaaniin sitoutuvan domeenin. CD44v kykenee sitomaan hyaluronaania ja on sidonnainen sen eksoneihin, jos osa variantti domeenista korvataan vaihtoehtoisella proteiinisekvenssillä, molekyylin sitoutumiskyky hyaluronaaniin kasvaa. CD44v:lta puuttuu O-glykosylaatio, mutta se pystyy sitomaan hyaluronaania yhtä tehokkaasti kuin kanoninen CD44 (engl. *standard CD44*, CD44s), joka ei sisällä yhtään variantteja eksoneita. N-glykosylaatio taas vähentää CD44 kykyä sitoutua hyaluronaaniin. (Sneath, Mangham 1998)



Kuva 2. Hyaluronaanin (HA) sitoutuminen CD44. A) Reaktio hidastuu post-translationalisten modifikaatioiden, kuten N-glykolysaation vuoksi. CS lisääminen CD44 saattaa estää HA sitoutumisen. B) Paikalliset CD44 pitoisuuden lisäykset saattavat parantaa vuorovaikutusta. C) Post-translationaliset modifikaatiot saattavat aiheuttaa konformaationaalisia muutoksia, jotka sitoutuvat HA:han eri tavalla. D) CD44 pitoisuuden lisäykset voivat lisätä HA:n sitoutumistodennäköisyyttä siten, että HA:n negatiiviset säätelijät eivät estä vuorovaikutusta. Kuvan lähde (Ruffell, Johnson 2009).

CD44 on mukana myös hyaluronaanin hajottamisessa, CD44-hyaluronaani -kompleksi liitetään lysosomiin, jossa happohydrolaasit (*acid hydrolases*) hyökkäävät sen kimppuun. Tämä on tärkeä

prosessi CD44 molekyylille, sen vuoksi, että hyaluronaanin kertyminen elimistöön aiheuttaa negatiivia vaikutuksia, esimerkiksi keuhkoissa se voi häiritä kaasujenvaihtoa (Sneath, Mangham 1998). CD44:n toinen ligandi, kondroitiini, on monilla tavoin läheinen hyaluronaanin kanssa ja sitoutuu samaan kohtaan CD44 molekyylin, kuin hyaluronaani. Kondroitiinin sulfaatti-sivuketjut avustavat kollageenin, laminiinin sekä fibronektiinin sitoutumista CD44 molekyylin. (Sneath, Mangham 1998)

Vuonna 1991 Günthert kollegoineen sai selville, että kun CD44 isoformi lisätään ei-metastaattiseen tuumoriin, se antaa kasvaimelle metastaattisia ominaisuuksia, tästä löydöksestä voitiin päätellä, että CD44 osallistuu metastaattiseen prosessiin eli etäpesäkkeet muodostuvat sen toiminnan avulla (Günthert, Hofmann et al. 1991). BCSC:t ilmentävät vahvasti CD44 molekyyliä ja sen läsnäolo saa BCSCs populaation pysymään multipotenttisenä eli niillä on kyky itseuudistua jakautumalla. Tämän vuoksi CD44 on ollut rintasyövän kantasoluhoidon tärkeänä kohteena. (Crabtree, Miele 2018)

3.2 CD24

Cluster of differentiation 24 (CD24), joka tunnetaan myös nimillä *heat-stable antigen* (HSA) tai *nectadrin*, on glykoproteiini samoin kuin CD44, eli siihen on liittynyt ainakin yksi hiilihydraattiryhmä. Se on todella pieni ja koostuu vain 30 aminohaposta, useissa solutyypeissä se on liittynyt solukalvoon fosfatidyyli-inositolin avulla (Kadmon, Eckert et al. 1992). CD24 esiintyy mm. B- ja T-lymfosyyteissä, jotka ovat immuunijärjestelmän soluja. B-solut syntyvät luuytimessä ja ne tuottavat vasta-aineita eli immunoglobuliineja, T-solut puolestaan viedään luuytimestä kateenkorvaan ja niistä muokkautuu erilaisia T-soluja; auttaja-T -solut (*T helper cells*, Th), sytotoksiset T-solut (*cytotoxic T-cells*, CTLs), säätelijä-T -solut (*regulatory T-cells*, Treg) sekä luonnolliset tappaja-T -solut (*natural killer T-cells*, NKT) (Kadmon, Eckert et al. 1992). CD24 pitoisuus on korkea naiiveissa B-soluissa (*naive B-cells*) eli soluissa, jotka eivät ole kohdanneet antigeenia, toisin kuin B-muistisoluissa (*memory B-cells*), joissa CD24 pitoisuus on hyvin matala. B-muistisolut ovat läpikäyneet immunoglobuliiniluokan vaihdon ”*Immunoglobulin class switching*” eli prosessin, jossa B-solu saadaan tuottamaan eri immunoglobuliini isotyyppejä, kuin aikaisemmin, esim. IgM -> IgG (Ettinger, Sims et al. 2005). T-soluissa puolestaan solut, jotka ovat positiivisia CD4 ja CD8 ilmentävät vahvasti CD24, kun taas suurin osa CD4⁺CD8⁺ ja CD4⁺CD8⁻ ilmentävät vain hieman CD24 molekyyliä. CD24 esiintyy myös myeloidisissa soluissa ja punasoluissa sekä kehittyvässä keskushermostossa ja neuroblastooman soluissa. (Kadmon, Eckert et al. 1992)

CD24 edistää solujen adheesiota eli auttaa niitä liikkumaan, se on mukana myös solujen jakautumisessa sekä etäpesäkkeiden muodostumisessa (Crabtree, Miele 2018). Solun pinnalla

tapahtuva, vasta-aineiden avustama CD24:n keräytyminen nostaa kalsiumin määrää B-lymfosyyteissä sekä granulosyyteissä. Tämä johtaa korkeampaan peroksidi tuotantoon, joten voidaan päätellä, että CD24 on mukana signaalinvälityksessä (*signal transduction*) (Kadmon, Eckert et al. 1992). Toisen tutkimuksen mukaan CD24:n keräytyminen edistää apoptoosia B-lymfosyyteissä varhaisen aktivointivaiheen aikana, joten todennäköisesti CD24:n liian suuri pitoisuus tai puuttuminen vaikuttaa solujen toimintaan (Schabath, Runz et al. 2006). Vuonna 1997 Aigner kollegoineen selvitti, että CD24 toimii ligandina P-selektiinille ihmisten tuumorisoluiissa, CD24 toiminta ligandina riippuu glykaanien modifikaatioista (Aigner, Sthoeger et al. 1997). Selektiinit ovat kalvon glykoproteiineja, jotka sitoutuvat oligosakkarideihin, niitä esiintyy kolmea eri tyyppiä; E-selektiinit, P-selektiinit sekä L-selektiinit. CD24 välitteinen sitoutuminen P-selektiiniin endoteelisoluissa ja verihiutaleissa, voisi helpottaa tuumorisolujen poistumista verenkierrasta ja siten edistää etäpesäkkeiden muodostumista (Schabath, Runz et al. 2006).

Ihmisillä CD24 esiintyy monissa pahanlaatuisissa syövässä; B-solulymfoomassa, munuaissyövässä, keuhkosityövässä, maksasyövässä, virtsarakon syövässä, munasarjasyövässä sekä rintasyövässä. Rinta-, munasarja-, paksusuoli- sekä eturauhassyövässä CD24 läsnäolo liitetään huonoon ennusteeseen sekä lyhyeen elinaikaan (Schabath, Runz et al. 2006). Rintasyövän kantasoluissa CD24 pitoisuus on yleensä hyvin matala, in vitro tutkimukset osoittavat, että CD24 lisääminen BCSCs estää niiden kantasoluominaisuuksia (Crabtree, Miele 2018).

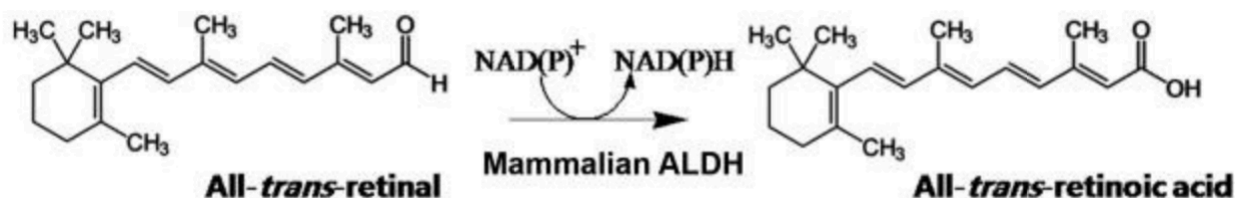
Kemokiinit ovat sytokiinin kaltaisia pieniä peptidejä, ne jaotellaan neljään eri ryhmään riippuen niiden kysteiini osista. Kemokiinien reseptorit ovat kalvon läpäiseviä, heterotrimeerisiä G-proteiineihin liittyneitä molekyylejä, kemokiineillä sekä niiden reseptoreilla on tärkeä tehtävä immuunivasteissa sekä hematopoieesissa. Schabath kollegoineen keskittyi tiettyyn kemokiinireseptoriin, *CXCR4*. Rintasyövän tuumoreissa *CXCR4* liittyminen sen ligandiin *SDF-1 α* (*CXCL12*) etäpesäkkeiden alueella (keuhkoissa tai maksassa), johtaa päätökseen, että *CXCR4/SDF-1*:llä on elintärkeä rooli elinspesifisessä rintasyövän etäpesäkkeiden muodostumisessa (Schabath, Runz et al. 2006).

3.3 ALDH1

Aldehydehydrogenasasi 1 (ALDH1) on myrkköjä poistava entsyymi, joka katalysoi esimerkiksi solunsisäisten aldehydien hapettumista, ALDH1 kuuluu aldehydidehydrogenaasi-proteiinien perheeseen ja sitä esiintyy maksassa (Ginestier, Hur et al. 2007). Hematopoieettisissa kantasoluissa (*hematopoietic stem cells*, HSCs) ALDH1 pitoisuus on suuri, joten sitä pidetään tärkeänä markkerina ihmisten HSC:lle. Chute kollegoineen osoitti tutkimuksissaan, että ALDH1 toimintaa pystytään

estämään DEAB:n (*diethylaminobenzaldehyde*) avulla, joka saa aikaan HSCs hitaamman erilastumisen, joka ilman estämistä tapahtuisi vasteena sytokiineille (Chute, Muramoto et al. 2006). DEAB lisäys myös vähensi retinoiinihapon reseptorivälitteistä signaalointia HSCs kanssa, osoittaen, että ALDH1 toiminnan estäminen edistää HSCs solun itsensäuudistamista, koska retinoiinihapon aktiivisuus vähenee (Chute, Muramoto et al. 2006).

Yksi ALDH1:n tärkeimmistä tehtävistä on retinolin eli A-vitamiinin hapettaminen retinoiinihapoksi, tämä on esitetty kuvassa 3. Hapettaessaan retinolia retinoiinihapoksi ALDH1 myös vaikuttaa kantasolujen jakaantumiseen. Lisääntynyttä ALDH1 aktiivisuutta esiintyy myeloomassa sekä akuutissa myeloidisessa leukemiassa (AML), joten ALDH1 aktiivisuus voi toimia markkerina sekä normaaleille että pahanlaatuisille kantasoluille. Terveestä rinnasta eristetyt solut, joilla on ALDH1 aktiivisuutta, muistuttavat fenotyypiltään ja toiminnaltaan rintarauhasen soluja. Rintasyövän tuumoreista otetut entsymaattiselle kokeelle ALDEFLUOR:lle positiiviset solut sisältävät CSCs. ALDEFLUOR kokeella saadaan tunnistettua ja eristettyä syövän kantasoluja, se on non-immunologinen fluoresoiva reagenssijärjestelmä, jossa tunnistetaan ALDH markkeria eri kudoksista (Opdenaker, Modarai, Boman 2015). Ginestier kollegoineen sai selville, että ALDH1 toimii markkerina rintasyövässä sekä sillä voidaan tehokkaasti ennustaa huonoja kliinisiä tuloksia. (Ginestier, Hur et al. 2007)



Kuva 3. Ihmisen ALDH1 avustama all-trans-retinolin hapettumisreaktio all-trans-retinoiinihapoksi. Kuvan lähde (Hong, Ngo et al. 2016).

4. BCSCs signaointi

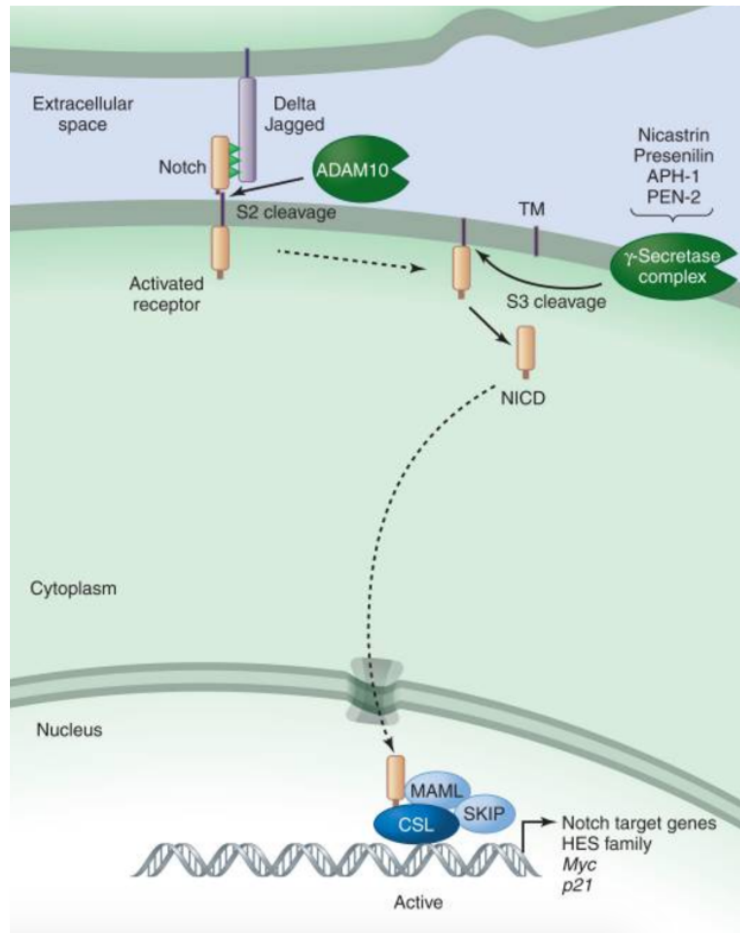
Rintarauhasen solujen signaointiin osallistuu monia signaointireittejä, parhaiten tunnettuja näistä ovat Notch, Hedgehog, Wnt sekä Hippo, ja sen vuoksi tämä tutkielma keskittyy niihin. Lisäksi tutkielmaan valittiin JAK/STAT signaointi, koska se on hyvin tunnettu ja tärkeä signaointireitti. Rintasyövän kantasoluissa nämä reitit saattavat aiheuttaa tuumoriresistanssin, syövän uusiutumisen

sekä etäpesäkkeiden muodostumisen. Näitä signaalintireittejä kohtaan on olemassa ja kehitteillä useita kliinisiä tutkimuksia. (Crabtree, Miele 2018)

4.1 Notch

Notch signaalintireitti yhdistetään moniin ihmisten syöpätyyppeihin, kuten kohdunkaulan- sekä keuhkojen karsinomaan sekä neuroblastomaan. Erityisesti se yhdistetään T-soluihin akuuttiin lymfaattiseen leukemiaan (T-ALL), jossa aktivoivat mutaatiot *Notch1*:ssä on havaittu yli 50 prosentissa tuumoreista. Syövässä esiintyvä Notch signaali on viallista, jonka vuoksi sillä on negatiiviset vaikutukset (Spyros Stylianou, Rob B. Clarke et al. 2006). Nisäkkäillä Notch signaalintireitti sisältää neljä Notch reseptoria; *Notch1*, 2, 3 ja 4 sekä viisi ligandia; *Delta-like-1 eli DLL-1*, 3, 4 sekä *Jagged1* ja 2. Notch-signaali aktivoidaan suoralla solu-solu vuorovaikutuksella, joka sisältää ligandi-reseptori sitoutumisen. Tätä seuraa Notch:n solunsisäisen domeenin (*intracellular domain of Notch*, NICD) pilkkoutuminen, sen jälkeen Notch:n sytoplasminen osa vapautuu sytoplasmaan ja kulkeutuu tumaan. Tumassa se sitoutuu transkriptionaaliseen repressoriin, joka johtaa Notch:n kohdegeenien derepressioon sekä koaktivaatioon, johtaen Notch reseptorin aktiiviseen muotoon. (Suman, Das et al. 2013)

Notch reseptorit ovat solukalvon proteiineja, jotka läpäisevät kalvon yhden kerran, ne koostuvat toiminnallisista domeeneista, joita ovat solun ulkoinen domeeni (*notch extracellular domain*, NECD), solukalvolla sijaitseva domeeni (*transmembrane domain*, TM) sekä solunsisäinen domeeni (*notch intracellular domain*, NICD). Notch reseptorit tuotetaan signaalin vastaanottavassa solussa Golgin laitteella sekä ER:llä glykosylaation avulla. Glykosylaation seurauksena muodostuu kalsiumstabiloitu heterodimeeri, joka koostuu NECD liittyneenä TM-NICD -domeeniin solukalvolla (*S1 cleavage*). Yksinkertaistettu Notch signaali on esitetty kuvassa 4. Kuten edellä mainittu *DLL1*, *DLL3*, *DLL4* sekä *Jagged1* ja 2 toimivat ligandeina Notch signaalin välityksessä, kun ligandi sitoutuu, NECD lohkaistaan irti TM-NICD domeenista (*S2 cleavage*). Signaalin vastaanottavassa solussa γ -sekretaasi vapauttaa NICD TM-domeenista (*S3 cleavage*), tämän seurauksena CSL transkriptiokompleksi sitoutuu ja Notch signaalin kohdegeenit Myc, p21 sekä HES-perhe aktivoituvat. (Kopan, Ilagan 2009)

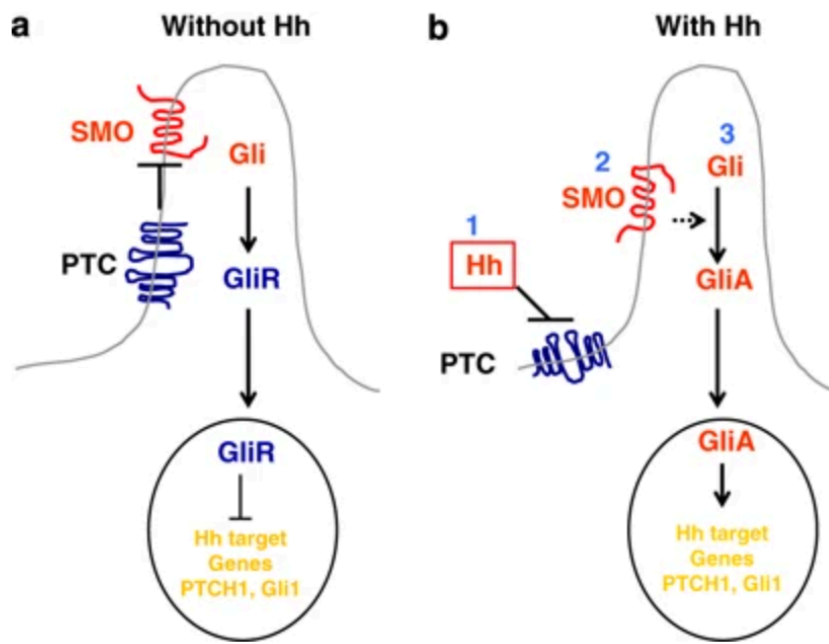


Kuva 4. Yksinkertaistettu Notch signaali (Kopan 2012).

Notch signaali *Notch4* avulla on tärkeää rintarauhasen muodostumiselle, Notch aktivointi edistää kantasolujen itseuudistumista ja jakautumista. Poikkeuksellinen ja viallinen Notch signaali voi olla mukana rintarauhasen kantasolujen itseuudistumisen deregulaatiossa, joka johtaa tuumorien muodostumiseen. Notch signaaliireitin esto vähentää BCSCs määrää ja vähentää rintarauhasen solujen muodostumista rintasyövän solulinjoissa. (Dontu, Jackson et al. 2004)

4.2 Hedgehog

Hedgehog (Hh) signaali on elintärkeää alkion kehityksen aikana, Hedgehog signaalin aktivaatiota esiintyy lähes kaikkien syöpätyyppien tuumoreissa. Geneettinen analyysi on osoittanut, että Hh signaalinolla on tärkeä rooli rintarauhasen morfogeneesissä, signaaliireitin komponenttia *Patched1* häiritäessä rintarauhasstiehyt kasvaa epänormaalisti. (Kubo, Nakamura et al. 2004)



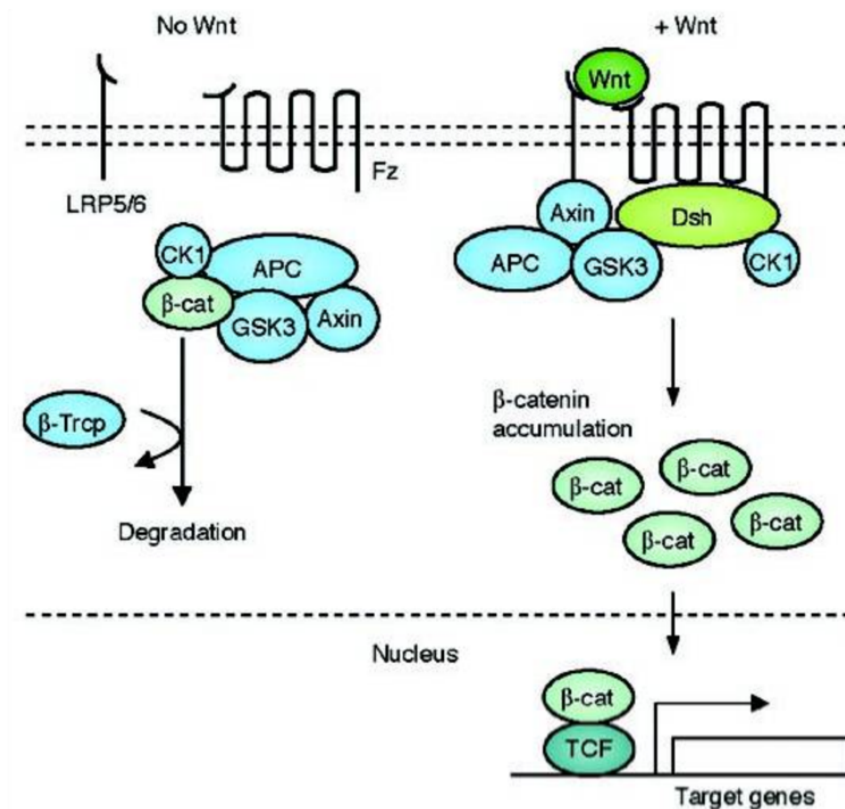
Kuva 5. Hedgehog signalointi. A) Ilman Hedgehog-signaalia, B) Hedgehogin ollessa läsnä. Kuvan lähde (Yang, Xie et al. 2010).

Toimiva Hedgehog signalointi vaatii sen ligandien säädellyn tuotannon, prosessoinnin, erityksen sekä kuljetuksen, Hh ligandeja ovat *Sonic* (Shh), *Indian* (Ihh) sekä *Desert* (Dhh). Hedgehog signalointi alkaa sitoutumisella kanoniseen reseptoriin *Patched1*:n sekä ko-reseptoreihin, Hh signalointi on esitetty kuvassa 5. Hedgehog:n sitoutuminen *Patched1*:n johtaa SMO proteiinin (*GPCR-like protein Smoothened*) ilmentymisen vähenemiseen. SMO on vastuussa signaalin välittämisestä downstream suuntaan eli 3'-suuntaan. SMO:n toimintaa säätelee TGF- β sytokiini, joka säätelee monia 3'-suuntaan kulkevia signaaleja sekä solun toimintoja. SMO:n toiminta saa aikaan GLI-proteiinien dissosioitumisen Kif7:stä, joka on kinesini-proteiini sekä tärkeimmästä solun ulkoisesta Hh signaloinnin säätelijästä SUFU:sta. GLI-proteiinit fosforyloidaan PKA:n, CK1:n sekä GSK3:n avulla, tämän seurauksena muodostuu Gli-R. Hh aktivoinnin seurauksena, GLI-proteiinit fosforyloidaan eri tavalla ja niistä muodostuu transkriptionaalisia aktivaattoreita, jotka saavat aikaan Hh:n kohdegeenien ekspression. (Yang, Xie et al. 2010; Evangelista, Tian et al. 2006)

4.3 Wnt

Wnt/ β -kateniini -signaloinnin vajaatoimintaa sekä sen viallista toimintaa esiintyy usein ihmisen eri syövässä, esimerkiksi rintasyövässä. Wnt-signalointi on tärkeää solun migraatiolle eli liikkumiselle, adheesiolle eli solujen kiinnittymiselle toisiinsa sekä solujen selviytymiselle. Wnt-signaloinnin ligandit lähettävät signaaleja kalvon läpi *Frizzled* reseptorien välityksellä. Tässä avustavat muut

erilaiset signaalintireitit, kuten Wnt/Ca²⁺, β -kateniini sekä reitti, joka parhaiten tunnetaan sen roolista polarisoida epiteelisoluja (PCP, engl. *planar cell polarity*). Wnt-signaalintireitti jaetaan itsenäiseen kanoniseen/ β -kateniini reittiin sekä itsenäiseen non-kanoniseen/ β -kateniini reittiin, joka sisältää Wnt/Ca²⁺ sekä PCP reitit. Wnt-signaali jaotellaan, mutta kuitenkin eri signaalintireitit ovat osaksi päällekkäisiä ja vaikuttavat toistensa toimintaan. (Loh, Hedditch et al. 2013)



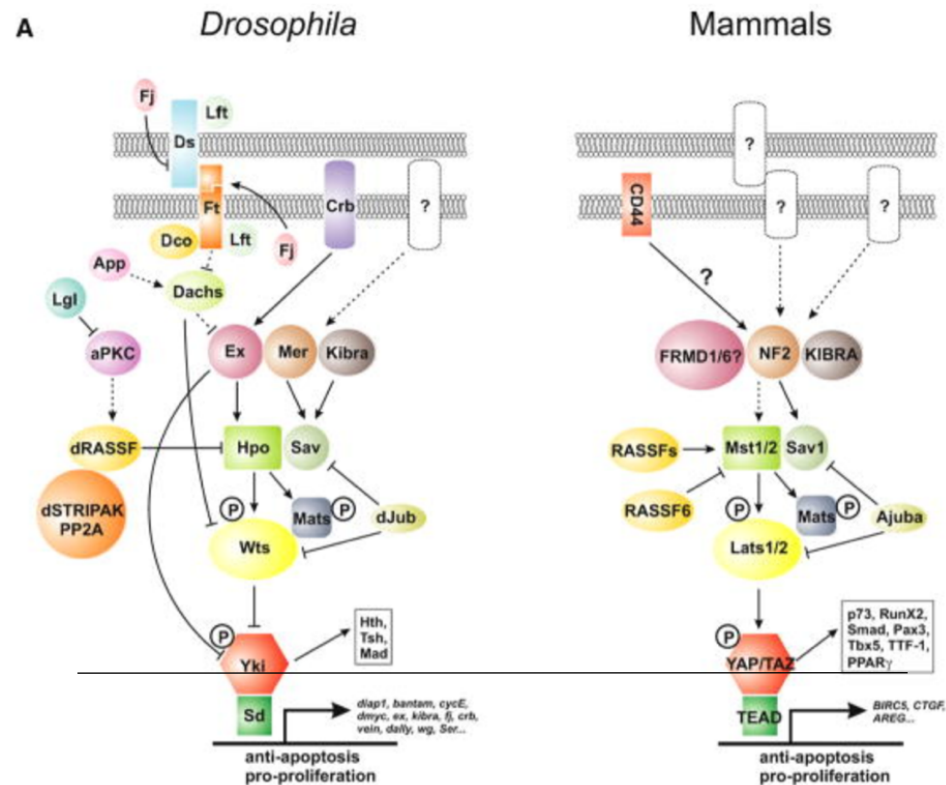
Kuva 6. Wnt signaali, vasemalla ilman Wnt-ligandin läsnäoloa ja oikealla Wnt-ligandin läsnäollessa. Kuvan lähde (Komiya, Habas 2008).

Wnt signaali on esitetty kuvassa 6. Wnt-ligandin puuttuessa APC/Axin/GSK-3 -kompleksin fosforylaatio saa aikaan β -kateniinin ubiquitinaation sekä proteasomaalisen hajotuksen. Wnt-ligandin aktivointi saa aikaan GSK-3 -kinaasin irtoamisen säätelystä kompleksista. Wnt-ligandin läsnäollessa ko-reseptori LRP5/6 lisätään Wnt-Frizzled kompleksiin. Tämä johtaa Dishevelled:n aktivaatioon fosforylaation, poly-ubikitinaation sekä polymerisaation kautta. Tämä prosessi syrjäyttää GSK-3:n APC/Axin -kompleksista. Stabiloitu β -kateniini kuljetetaan tumaan, missä se sitoutuu LEF/TCF-transkriptiotekijöihin, syrjäyttäen ko-repressorit. β -kateniini myös hankkii uusia ko-aktivaattoreita Wnt kohdegeeneihin. (Komiya, Habas 2008) Wnt signaali on tärkeässä roolissa kantasolujen kontrollissa normaaleissa kudoksissa, sekä nisäkkäiden tuumorigeneesissä. BCSC:t

joissa Wnt/ β -kateniini signalointia esiintyy enemmän ovat enemmän tuumorigeenisiä, kuin BCSCs joissa signalointi on vähäistä tai ei esiinny ollenkaan (Crabtree, Miele 2018).

4.4 Hippo

Hippo-signaloinnilla on tärkeä rooli elinten koon hallinnassa, Hippo säätelee solujen lisääntymistä, apoptoosia sekä kantasolujen itseuudistumista. Hippo-signaloinnin viallinen toiminta eli deregulaatio edistää syövän muodostumista. Hippo-signaloinnin proteiinkinaasi -kaskadi stimuloi transkriptionaalisen ko-aktivaattorin YAP (*Yes-associated protein*) inaktivaatiota. Hippo-signalointi löydettiin ensin *Drosophila*:lta, mutta myös nisäkkäiden Hippo-signalointia on tutkittu, kuitenkin *Drosophila*:n Hippo signaloinnista tiedetään paljon enemmän. *Drosophila*:n sekä nisäkkäiden Hippo-signalointi on esitetty kuvassa 7. (Kim, Koh et al. 2011)



Kuva 7. Hippo-signalointi reitti *Drosophila*:lla sekä nisäkkäillä. Kuvan lähde (Pan 2010).

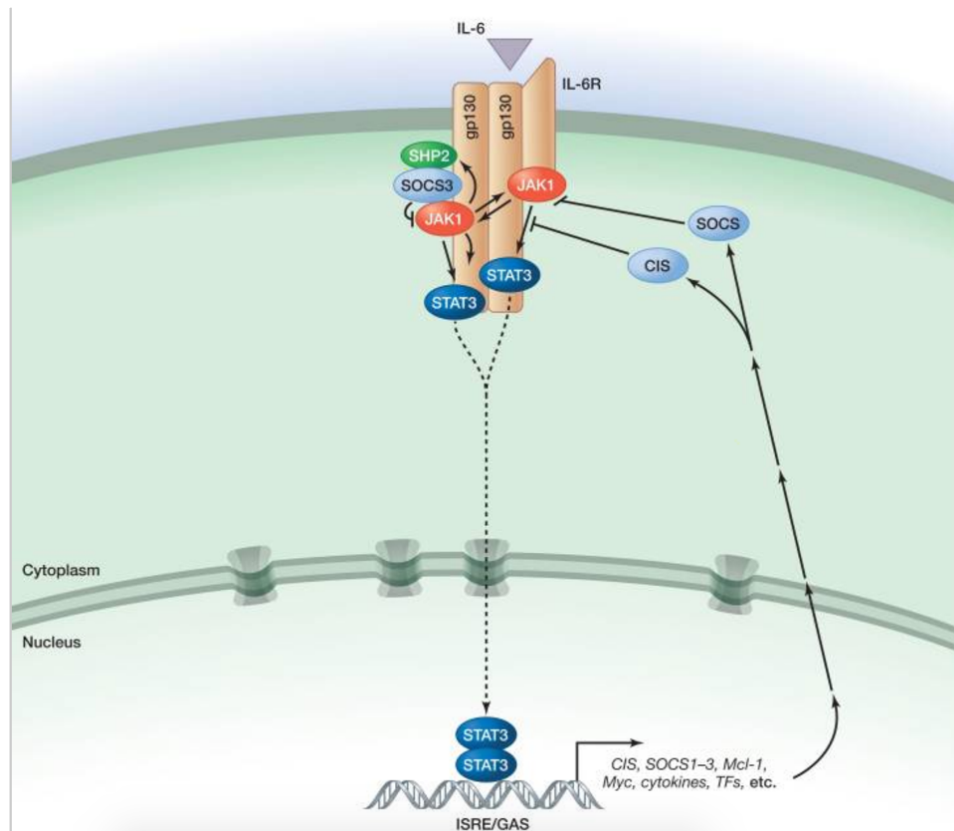
Hippo-signaloinnin ydin on kinaasi kaskadi, jossa *Mst1/2*-kinaasit sekä *SAVI* muodostavat kompleksin, jotta *LATS1/2* voitaisiin fosforyloida sekä aktivoida. *LATS1/2* vuorostaan fosforyloi sekä estää ko-aktivaattoreiden YAP sekä TAZ kohdegeenien transkription. YAP ja TAZ ovat kaksi tärkeintä Hippo-signalointiin vaikuttavaa tekijää. Defosforylaation jälkeen, YAP sekä TAZ kulkeutuvat tumaan ja vuorovaikuttavat erilaisten transkriptiotekijöiden kanssa. Hippo-signalointi

estää solujen vuorovaikutusta keskenään ja sen toimintaa säädellään monin tavoin, *Mst1/2* sekä *LATS1/2* toimintaa säädellään erilaisten molekyylien avulla. *Mst1/2* sekä YAP/TAZ fosforylaatioita ja aktiivisuutta säädellään fosfataasien avulla, *LATS1/2* sekä YAP/TAZ stabiilisuutta säädellään proteiinien ubiquinaation avulla ja *LATS1/2*:n aktiivisuutta säädellään myös solunsisäisen tukirangan avulla. Vaikka Hippo-signaalointia on tutkittu paljon viimeisen vuosikymmenen aikana, siltikään sitä ei tunneta kovin hyvin. (Pan 2010)

Hippo-signaalointia säädellään G-proteiineihin liittyneillä reseptoreilla (*G-protein coupled receptors*, GPCRs) sekä G-proteiineihin liittyneillä estrogeenireseptoreilla (*G-protein coupled estrogen receptor*, GPER). GPER:t säätelevät monien geenien ilmentymistä rintasyövän kantasoluissa. On mahdollista, että GPER:t säätelevät Hippo-signaalointia, kontrolloiden rintasyöpäsolujen lisääntymistä. (Zhou, Wang et al. 2015)

4.5 JAK/STAT

JAK/STAT (*the Janus kinase/signal transducers and activators of transcription pathway*) signalointi nisäkkäillä on tärkein viestintämekanismi, jota säädellään sytokiineilla sekä kasvutekijöillä. JAK-aktivointi edistää solujen nopeaa lisääntymistä, erilaistumista, migraatiota eli liikkumista sekä apoptoosia. Nämä tapahtumat ovat elintärkeitä hematopoieesille, immuunijärjestelmän kehitykselle, rintarauhasen muodostumiselle sekä imetykselle, apidogeneesille sekä sukupuolen muodostumiselle. Mutaatiot, jotka vähentävät JAK/STAT-signaaloinnin toimintaa vaikuttavat näihin solutoimintoihin, toisin sanoen mutaatiot, jotka olennaisesti aktivoivat tai estävät JAK-signaalointia aiheuttavat tulehduksia ja muita ongelmia. (Rawlings, Rosler et al. 2004)



Kuva 8. Yksinkertaistettu JAK/STAT-signalointi. Kuvan lähde (Harrison 2012).

JAK/STAT-signalointi on esitetty kuvassa 8 ja siinä esiintyy vain muutama pääkomponentti, nimittäin neljä JAK perheen jäsentä: JAK1, JAK2, JAK3 sekä Tyk2. JAK aktivointi tapahtuu, kun kaksi JAK komponenttia tuodaan lähelle toisiaan ja transfosforylaatio tapahtuu. Aktivoidut JAK kinaasit fosforyloivat niiden tärkeimpiä substraatteja STAT transkriptiotekijöitä. Nisäkkäillä esiintyy seitsemän STAT isoformia, jotka sijaitsevat sytoplasmassa ennen aktivointia. STAT molekyyliellä on tyrosiini-aminohappojäännös lähellä C-terminaalia, joka fosforyloidaan JAK kinaaseilla. Fosforyloidut STAT molekyylit kulkeutuvat tumaan, jossa ne sitoutuvat spesifisiin säätelysekvensseihin. Tästä johtuen ne voivat aktivoida tai estää kohdegeenien transkriptiota. (Rawlings, Rosler et al. 2004).

JAK/STAT-signaaloinnissa esiintyy myös negatiivisia säätelijöitä, jotka vaikuttavat signaloinnin toimintaan, esimerkiksi SOCS (*suppressors of cytokine signaling*), PIAS (*protein inhibitors of activated stats*) sekä PTP:t (*protein tyrosine phosphatases*). Aktivoidut STAT molekyylit stimuloivat SOCS proteiinien geenien transkriptiota, johtaen SOCS proteiinien sitoutumiseen fosforyloituneisiin JAK komponentteihin sekä niiden reseptoreihin. Tämä estää JAK/STAT-signaaloinnin toimintaa. PIAS proteiinit sitoutuvat aktivoituihin STAT dimeereihin ja estävät DNA:n sitoutumista niihin.

PTP:den negatiivinen vaikutus on yksinkertainen, sillä ne kääntävät JAK komponenttien toiminnan päinvastaiseksi. (Rawlings, Rosler et al. 2004)

JAK/STAT-signaali esiintyy rintasyövän tuumorigeneesissä, aktivoitu STAT3 esiintyy 50-60% kaikista rintasyövistä. STAT3 osallistuu syöpäsolujen nopeaan lisääntymiseen, angiogeneesiin sekä etäpesäkkeiden muodostumiseen. Erityisesti *autokriini/parakriini IL-6/JAK/STAT3 silmukka* (engl. *autocrine/paracrine IL-6/JAK/STAT3 feed-forward loop*) stimuloi kasvaimen etenemistä sekä metastaasien eli etäpesäkkeiden muodostumista. (Khanna, Lee et al. 2018)

5. MikroRNA:n rooli rintasyövässä

MikroRNA:t (miRNAs) ovat pieniä ei-koodaavia RNA:ta, jotka säätelevät mRNA:n translaatiota estämällä ribosomien toimintaa, deadenyloimalla poly-A-häntää sekä hajottamalla mRNA:ta. miRNA:t pystyvät säätelemään yhtä aikaa satoja mRNA:ta, täten ne kontrolloivat monia solutoimintoja kuten, solujen nopeaa lisääntymistä, kantasolujen toiminnan ylläpitoa sekä erilaistumista. Parhaiten tunnettu miRNA on *let-7*, joka löydettiin geneettisellä analyysillä *Caenorhabditis elegans* nimisen sukkulamadon sellaisista mutanteista, joilla oli puutteita kehityksen ajoituksessa (Reinhart, Slack et al. 2000). Myöhemmin löydettiin *Dicer* niminen ribonukleaasi, joka on tärkein miRNA:n prosessoinnin ja toiminnan entsyymi, mutaatiot ilman *Dicer*:a johtavat alkioden kuolevuuteen sekä kantasolujen määrän vähenemiseen (Bernstein, Kim 2003). Kudosspesifinen *Dicer*:n poisto vaikuttaa alkion kantasolujen itseuusiutumiseen, B-lymfosyytti solujen kehitykseen sekä kudosten morfogeneesiin (Chen, Murchison 2008). Iholla miR-203 on kantasolujen ylläpidon kriittinen säätelijä, toinen miRNA:n prosessoinnin tärkeä entsyymi on *DGCR8*. *DGCR8*:n poistaminen muuttaa alkion kantasolujen itsensä uusiutuvien geenien toimintaa. Tutkimukset, jotka ovat tehneet nämä havainnot (esimerkiksi Wang, Medvid et al. 2007; Yi, Poy et al. 2008) osoittavat, että miRNA:t ovat tärkeitä solujen uusiutumisen sekä erilaistumisen säätelijöitä. Monet yleiset syövän kromosomaaliset monistumiset sekä deleetiot sisältävät miRNA:ta koodaavia sekvenssejä, ja jotkin miRNA:t toimivat onkogeeneinä tai antionkogeeneinä eli tuumorisuppressorigeeneinä (Calin, Sevignani 2004). miR-17-92 klusterin vajaatoiminta edistää B-solulymfoomaa ja *let-7* säätelyn vähentäminen yhdistetään tuumoreiden syntymiseen sekä huonoon ennusteeseen keuhkosityöpöpotilailla. *let-7* ekspressio myös ehkäisee tuumoreiden muodostumista rintasyövän solulinjoissa (Shimono, Zabala et al. 2009).

Shimono kollegoineen vertaili miRNA-transkription ilmentymistä ihmisen CD44⁺CD24^{-low} linjan rintasyövän kantasoluissa sekä non-tuumorigeenisissä rintasyövän soluissa (Shimono, Zabala et al. 2009). Tutkimuksessa siis käytettiin hyväksi rintasyövän biomarkkereita, jotka on mainittu aikaisemmin tässä tutkielmassa. Monilla rintasyöpöpotilailla, vain osa CD44⁺CD24^{-low} linjan

syöpäsoluista on erittäin tuumorigeenisiä, verrattuna non-tuumorigeenisiin rintasyövänsoluihin. CD44⁺CD24^{-/low} linjan soluilla on siis kantasolumaisia ominaisuuksia, kuten kyky itseuusiutua sekä erilaistua. Ne myös kykenevät myös muodostamaan tuumorin vain 200 solusta, kun taas non-tuumorigeeniset rintasyövän solut eivät pysty tähän edes tuhansilla soluilla. (Shimono, Zabala et al. 2009)

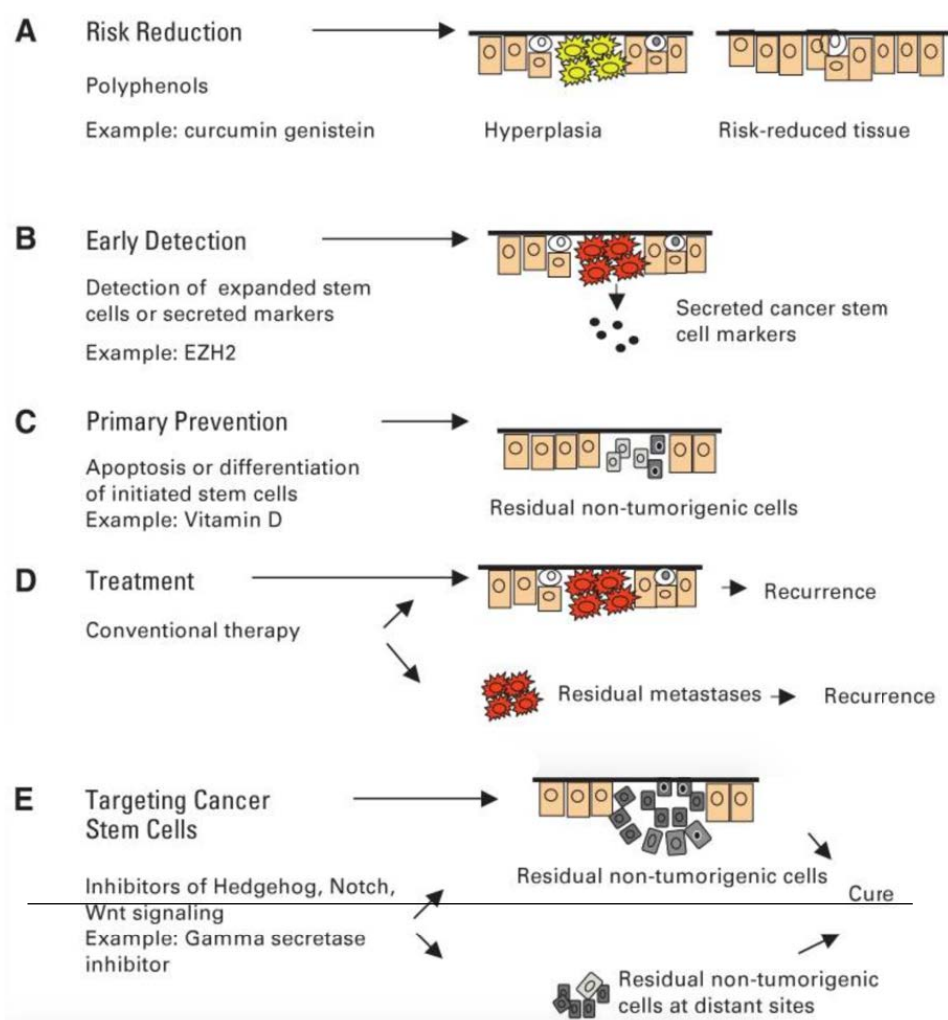
Normaalien kantasolujen sekä syövän kantasolujen välillä on se ero, että normaalien kantasolujen määrä kudoksessa on tarkoin säädelty ja liiallinen uusiutuminen on estetty, kun taas syövän kantasolut uusiutuvat jatkuvasti johtaen tuumorien muodostumiseen. On siis todennäköistä, että CSCs uusiutuminen sisältää samoja elementtejä kuin normaalien kantasolujen uusiutuminen, Shimono kollegoineen tutkimuksessaan osoitti, että BCSCs ja normaaleilla rintarauhasen soluilla on samankaltainen miRNA profiili ja jotkin näistä miRNA:sta (engl. *oncomirs*) on liitetty syövän muodostumiseen. (Shimono, Zabala et al. 2009)

Calin kollegoineen sai selville, että miRNA:t voivat toimivat tuumorisuppressoreina (Calin, Sevignani et al. 2004). Tutkimus osoitti, että potilailla, joilla on diagnosoitu leukemia tai krooninen lymfaattinen leukemia (KLL), on usein muutaman miRNA:n säätelyn puutetta tai ne puuttuvat kokonaan (Calin, Sevignani et al. 2004). Nämä miRNA:t ovat *mir-15a* sekä *mir-16-1*, 65%:lla KLL-potilaista nämä miRNA:t puuttuvat 13q14 lokuksesta. Potilailla, joilla on 13q14 deleetio, on parempi ennuste, kuin potilailla, joilla deleetio on tapahtunut jossain toisessa lokuksessa. Tämä saattaa johtua siitä, että *mir-15a* sekä *mir-16-1* esiintyvät ryppäissä kromosomissa 3, eli niillä on itseään vastaavat muodot *mir-15b* sekä *mir-16-2*. Tästä johtuen 13q14 deleetiot eivät johda näiden miRNA:den täydelliseen eliminaatioon KLL-potilailla (Esquela-Kerscher, Slack 2006). Cimmino kollegoineen selvitti, että *mir-15a* sekä *mir-16-1* säätelevät negatiivisesti *BCL2*, joka on anti-apoptoottinen geeni. *BCL2* esiintyy yleensä ylimäärin monissa syöpätyypeissä, joten uskotaan, että *mir-15a* sekä *mir-16-1* deleetiot nostavat *BCL2*:n pitoisuutta ja siten edistävät syövän syntyä (Cimmino, Calin et al. 2005). Normaalista kudoksesta löytyy yhtä paljon *mir-143* sekä *mir-145*, kuin syöpäkudoksesta. Kuitenkin kolorektaalisyövässä niiden pitoisuudet ovat hyvin vähäisiä, joten arvellaan ovatko nämä miRNA:t suorassa yhteydessä tähän syöpätyyppiin. Tästä ei kuitenkaan olla varmoja, koska niiden säätely on vähäistä myös esimerkiksi rinta- sekä prostatasyövässä (Michael, O'Connor et al. 2003).

Glioblastoomassa *mir-21*:n säätelyä tapahtuu paljon enemmän kuin normaalissa kudoksessa. Tutkimukset osoittavat, että glioblastooman solulinjoissa, *mir-21* säätelee solujen kasvua estämällä apoptoosia. *mir-21* toiminta ei kuitenkaan vaikuta solujen erilaistumiseen, joka osoittaa, että tämä miRNA on onkogeeninen eli sen toiminta voi johtaa kasvaimen syntymiseen (Chan, Krichevsky Kosik 2005).

6. Rintasyövän terapia ja terapiaresistanssi

Nykyisissä rintasyövän tutkimuksissa tärkeänä pidetään CSC-hypoteesia (*cancer stem-cell hypothesis*), tuumorit syntyvät rintarauhasen soluista, uusiutumisen säätelyn deregulaation eli häiriintyneen toiminnan kautta, joka on normaalisti tarkoin säädeltyä. Tämän seurauksena tuumorit sisältävät kantasolumaisia ominaisuuksia, kuten kyvyn itseuusiutua, joka ohjaa tuumorigeneesiä sekä erilaistumista. Kantasoluteknologian kehityksen ansiosta nykyään voidaan tunnistaa kantasolut normaalista sekä pahanlaatuisesta rintakudoksesta. Näiden kantasolujen tutkimus on auttanut tutkimaan ihmisen rintasyöpää molekyylitasolla, CSCs-hypoteesin avulla voidaan havaita syöpä varhaisessa vaiheessa, ehkäistä sekä hoitaa sitä. (Kakarala, Wicha 2008)



Kuva 9. Kliiniset kantasoluille tehtävät toimenpiteet syövän ehkäisemiseksi sekä hoitamiseksi.

A) Riskin vähentäminen, B) Varhain havaitseminen, C) Ensisijainen ehkäisy, D) Hoito, E) Hoidon kohdistaminen syövän kantasoluihin. Kuvan lähde (Kakarala, Wicha 2008).

Nykyisin on olemassa erilaisia toimenpiteitä, joilla voidaan vaikuttaa syövän kantasolujen ominaisuuksiin (kuva 9). Näillä keinoilla voidaan ehkäistä syövän kehittymistä sekä hoitaa jo olemassa olevaa syöpää. Syövän riskiä voidaan yrittää vähentää kudoksissa, joissa esiintyy hyperplasiaa eli solujen liikakasvua. Hyperplasiaa voidaan ehkäistä esimerkiksi polyfenolien avulla (Pandey, Rizvi 2009). Polyfenolit ovat anti-inflammatorisia eli tulehdusta vähentäviä molekyylejä, joita esiintyy muun muassa erilaissa hedelmissä, vihanneksissa sekä marjoissa (Pandey, Rizvi 2009). Spesifisten biomarkkereiden avulla syövän kantasolut voitaisiin havaita varhaisessa vaiheessa, jolloin syövän poistaminen kirurgisesti on vielä mahdollista. Tällaisia biomarkkereita ovat esimerkiksi tässä tutkielmassa aikaisemmin mainitut markerit (Kakarala, Wicha 2008).

Syövän kantasolujen kasvua voidaan estää aktivoimalla niiden apoptoosia tai erilaistumista. Estämällä syövän kantasolujen erilaisia signaalointireittejä, kuten Notch, Hedgehog sekä muita tässä tutkielmassa aiemmin mainittuja signaalointireittejä, voidaan estää niiden toimintaa (Kakarala, Wicha 2008). Mikäli rintasyövän tuumorit muodostuvat kuten edellä mainittu, BCSC:n määrä saattaa olla riskitekijä syövän syntymiselle eli karsinogeneesille. Rintarauhasen kehitykselle on määritetty kolme tärkeää vaihetta: alkionkehitys, murrosikä sekä raskaus; muutokset hormonitoiminnassa voivat vaikuttaa BCSCs määrään johtaen mahdolliseen karsinogeneesiin (Dontu, Liu et al. 2005). Insuliinin kaltainen kasvutekijä (IGF-1; engl. *insulin-like growth factor*) saattaa olla aikuisten kantasolujen tärkein säätelijä eri elimissä (Jenkins 2004). Kasvuhormonia (hGF; engl. *human growth hormone*) eritetään aivolisäkkeestä sekä se on tärkeä säätelijä IGF-1 synteesissä sekä erityksessä. Kasvuhormoni säätelee epäsuorasti solujen nopeaa jakautumista IGF-1:n kautta, se myös vaikuttaa suoraan soluihin, jotka ilmentävät kasvuhormonireseptoria stimuloimalla JAK/STAT-signaalointia (Savarese, Strohsnitter et al. 2007). Rintasyöpäriskin sekä kasvuhormonin määrän välillä on yhteys, kasvuhormin säätelämä nopea pituuskasvu teini-ikäisenä, liittyy voimakkaasti myöhempään rintasyövän riskiin (Ahlgren, Melbye et al. 2004). Naiset, jotka sairastavat korkeista kasvuhormonitasoista johtuvaa akromegaliaa eli ”jättikärkisyyttä”, omaavat lisääntyneen riskin syövän kehittymiselle (Jenkins 2004). Korkeat estrogeeni sekä progesteroni tasot raskauden viimeisellä kolmanneksella, saavat aikaan lisääntyneen kasvuhormonin tuotannon. Tästä voidaan päätellä, että aggressiiviset basaaliset rintakarsinoomat voivat johtua suurenevasta kasvuhormin määrästä (Kakarala, Wicha 2008).

Nanoteknologiaa pidetään nykyään potentiaalisena vaihtoehtona rintasyövän kantasolujen tunnistamiselle, nanohiukkasteknologian tavoite on edistää kemoterapeuttisten lääkkeiden kuljetusta tuumoriin, käyttämällä BCSCs tarkoitettuja nanohiukkasia. Tällä hetkellä on käynnissä tutkimus, jossa käytetään LTLD:tä (*lysothermosensitive liposomal doxorubicin*) korkeampien

lääkepitoisuuksien saavuttamiseksi metastaattisessa HER-2 negatiivisissa rintasyöpäpotilaissa (Scioli, Storti et al. 2019).

Tämän hetkisten tutkimustulosten mukaan, syövän kantasoluilla on keskeinen rooli syöpälääkeresistanssissa sekä tuumorien uusiutumisessa, rintasyövän kantasoluja on yritetty eristää sekä tunnistaa monilla tavoilla. Lupaavin tapa tunnistaa BCSC:t ja kohdistaa hoito niihin, on yhdistellä sekä soveltaa erilaisia terapeuttisia menetelmiä. Valitettavasti kuitenkin tulos on usein epäjohdonmukainen, sillä nykyisten biomarkkerien avulla on vaikeaa tunnistaa yksi pieni solupopulaatio (Lee, Lytton-Jean et al. 2012). Nano- sekä bioteknologiat yhdistettynä geeneihin kohdistettuihin hoitoihin (*gene targeting strategies*), ovat lupaavin lähestymistapa syövän kantasoluille tarkoitettujen lääkkeiden kehittämisessä, joilla voitaisiin edistää rintasyöpähoitojen tehokkuutta (Scioli, Storti et al. 2019).

7. Kirjallisuusviitteet

- Suomen Syöpärekisteri (2017) Syöpä 2017 -raportti. [viitattu 10.3.2020] Saatavilla: <https://syoparekisteri.fi/tilastot/syopa-2017-raportti/>
- Ahlgren M, Melbye M, Wohlfahrt J and Sørensen TIA, 2004. Growth Patterns and the Risk of Breast Cancer in Women. *New England Journal of Medicine*, 351(16), pp. 1619-1626.
- Aigner S, Sthoeger ZM, Fogel M, Webe E, Zarn J, Ruppert M, Zeller Y, Vestweber D, Stahel R, Sammar M and Altevogt P, 1997. CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells. *Blood*, 89(9), pp. 3385-3395.
- Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, Mills AA, Elledge SJ, Anderson KV and Hannon GJ, 2003. Dicer is essential for mouse development. *Nat. Genet.* 35, pp. 215–217.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Notch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F and Negrini M, 2004. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, pp. 2999–3004.
- Chan JA, Krichevsky AM and Kosik KS, 2005. MicroRNA-21 Is an Antiapoptotic Factor in Human Glioblastoma Cells. *Cancer Research* 65(14):6029-33. doi: 10.1158/0008-5472.can-05-0137
- Chen JF, Murchison EP, Tang R, Callis TE, Tatsuguchi M, Deng Z, Rojas M, Hammond SM, Schneider MD and Selzman CH, 2008. Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, pp. 2111–2116.
- Chute JP, Muramoto GG, Whitesides J, Colvin M, Safi R, Chao NJ and McDonnell DP, 2006. Inhibition of Aldehyde Dehydrogenase and Retinoid Signaling Induces the Expansion of Human Hematopoietic Stem Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(31), pp. 11707-11712.
- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volonia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M and Croce CM, 2005. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(39):13944-9. doi:10.1073/pnas.0506654102
- Crabtree JS and Miele L, 2018. Breast Cancer Stem Cells. *Biomedicines*, 6(3):77. doi: 10.3390/biomedicines6030077
- Dontu G, Jackson KW, McNicholas E, Kawamura MJ, Abdallah WM and Wicha MS, 2004. Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast cancer research: BCR*, 6(6), pp. R605-R615.
- Dontu G, Liu S and Wicha MS, 2005. Stem cells in mammary development and carcinogenesis: implications for prevention and treatment. *Stem Cell Reviews*, 1(3), pp. 207-213.
- Duodecim, 2017. Rintasyöpä: toteaminen ja ennuste. [viitattu 11.3.2020] Saatavilla: http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00618

Esquela-Kerscher A and Slack FJ, 2006. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer* volume 6, pp. 259–269

Ettinger R, Sims GP, Fairhurst A, Robbins R, Da Silva YS, Spolski R, Leonard WJ and Lipsky PE, 2005. IL-21 Induces Differentiation of Human Naive and Memory B Cells into Antibody-Secreting Plasma Cells. *The Journal of Immunology*, 175(12), pp. 7867-7879.

Evangelista M, Tian H and De Sauvage FJ, 2006. The Hedgehog Signaling Pathway in Cancer. *Clinical Cancer Research*, 12(20), pp. 5924-5928.

Gener P, Montero S, Xandri-Monje H, Díaz-Riascos Z, Rafael D, Andrade F, Martínez-Trucharte F, González P, Seras-Franzoso J, Manzano A, Arango D, Sayós J, Abasolo J, Schwartz S, 2020. *Zileuton™ loaded in polymer micelles effectively reduce breast cancer circulating tumor cells and intratumoral cancer stem cells*. doi.org/10.1016/j.nano.2019.102106

Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS and Dontu G, 2007. ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. *Cell stem cell*, 1(5), pp. 555-567.

Günthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zöller M, Haußmann I, Matzku S, Wenzel A, Ponta H and Herrlich P, 1991. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell*, 65(1), pp. 13-24.

Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA and Lander ES, 2009. Identification of Selective Inhibitors of Cancer Stem Cells by High-Throughput Screening. *Cell*, 138(4), pp. 645-659.

Harrison DA, 2012. The JAK/STAT Pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(3). pii: a011205. doi: 10.1101/cshperspect.a011205.

Heino J and Vuento M, 2015. *Biokemian ja solubiologian perusteet*. Helsinki: Sanoma Pro Oy.

Hong S, Ngo H, Nam H, Kim K, Kang L and Oh D, 2016. Alternative Biotransformation of Retinal to Retinoic Acid or Retinol by an Aldehyde Dehydrogenase from *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(13), pp. 3940-3946.

Jenkins PJ, 2004. Acromegaly and cancer. *Hormone Research*, 62 Suppl 1, pp. 108-115.

Kadmon G, Eckert M, Sammar M, Schachner M and Altevogt P, 1992. Nectadrin, the heat-stable antigen, is a cell adhesion molecule. *Journal of Cell Biology*, 118(5), pp. 1245-1258.

Kakarala M and Wicha MS, 2008. Implications of the Cancer Stem-Cell Hypothesis for Breast Cancer Prevention and Therapy. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(17), pp. 2813-2820.

Kelly PN, Dakic A, Adams JM, Nutt SL and Strasser A, 2007. Tumor Growth Need Not Be Driven by Rare Cancer Stem Cells. *Science*, 317(5836), pp. 337.

- Khanna P, Lee JS, Sereemasapun A, Lee H and Baeg GH, 2018. GRAMD1B regulates cell migration in breast cancer cells through JAK/STAT and Akt signaling. *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1-10.
- Kim N, Koh E, Chen X and Gumbiner BM, 2011. E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(29), pp. 11930-11935.
- Komiya Y and Habas R, 2008. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, 4(2), pp. 68-75. doi: 10.4161/org.4.2.5851
- Kopan R, 2012. Notch Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(10). pii:a011213. doi: 10.1101/cshperspect.a011213.
- Kopan R and Ilagan MXG, 2009. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell*, 137(2), pp. 216-233.
- Kubo M, Nakamura M, Tasaki A, Yamanaka N, Nakashima H, Nomura M, Kuroki S and Katano M, 2004. Hedgehog Signaling Pathway is a New Therapeutic Target for Patients with Breast Cancer. *Cancer Research*, 64(17), pp. 6071-6074.
- Lee H, Lytton-Jean AKR, Chen Y, Love KT, Park AI, Karagiannis ED, Sehgal A, Querbess W, Zurenko CS, Jayaraman M, Peng CG, Charisse K, Borodovsky A, Manoharan M, Donahoe JS, Truelove J, Nahrendorf M, Langer R and Anderson DG, 2012. Molecularly Self-Assembled Nucleic Acid Nanoparticles for Targeted In Vivo siRNA Delivery. *Nature nanotechnology*, 7(6), pp. 389-393.
- Liu Z, Liu G, Yang W, Di G, Lu J, Shen K, Shen Z, Shao Z and Wu J, 2008. Triple-negative breast cancer types exhibit a distinct poor clinical characteristic in lymph node-negative Chinese patients. *Oncology reports*, 20(4), pp. 987.
- Loh YN, Hedditch EL, Baker LA, Jary E, Ward RL and Ford CE, 2013. The Wnt signalling pathway is upregulated in an in vitro model of acquired tamoxifen resistant breast cancer. *BMC Cancer*, 13, pp. 174.
- Lombardo Y, De Giorgio A, Coombes CR, Stebbing J and Castellano L, 2015. Mammosphere Formation Assay from Human Breast Cancer Tissues and Cell Lines. *Journal of Visualized Experiment: JoVE*, (97). doi: 10.3791/52671.
- Michael MZ, O'Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP and James RJ, 2003. Reduced Accumulation of Specific MicroRNAs in Colorectal Neoplasia. *Molecular Cancer Research*, Vol. 1, pp. 882-891.
- Opdenaker LM, Modarai SR and Boman BM, 2015. The Proportion of ALDEFLUOR-Positive Cancer Stem Cells Changes with Cell Culture Density Due to the Expression of Different ALDH Isoforms. *Cancer Stud Mol Med*. 2(2): 87-95. doi: [10.17140/CSMMOJ-2-113](https://doi.org/10.17140/CSMMOJ-2-113)
- Pan D, 2010. The Hippo Signaling Pathway in Development and Cancer. *Developmental cell*, 19(4), pp. 491-505.
- Pandey KB and Rizvi SI, 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), pp. 270-278.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR and Ruvkun G, 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, pp. 901–906.

Rawlings JS, Rosler KM and Harrison DA, 2004. The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of cell science*, 117(Pt 8), pp. 1281-1283.

Ruffell B and Johnson P, 2009. The regulation and function of hyaluronan binding by CD44 in the immune system. *Glycoforum*, Vol.13, A1. Saatavissa: <https://www.glycoforum.gr.jp/article/13A1.html>

Savarese TM, Strohsnitter WC, Low HP, Liu Q, Baik I, Okulicz W, Chelmsow DP, Lagiou P, Quesenberry PJ, Noller KL and Hsieh C, 2007. Correlation of umbilical cord blood hormones and growth factors with stem cell potential: implications for the prenatal origin of breast cancer hypothesis. *Breast cancer research: BCR*, 9(3), pp. R29.

Schabath H, Runz S, Joumaa S and Altevogt P, 2006. CD24 affects CXCR4 function in pre-B lymphocytes and breast carcinoma cells. *Journal of Cell Science*, 119(2), pp. 314-325.

Scioli MG, Storti G, D'Amico F, Gentile P, Fabbri G, Cervelli V and Orlandi A, 2019. The Role of Breast Cancer Stem Cells as a Prognostic Marker and a Target to Improve the Efficacy of Breast Cancer Therapy. *Cancers*, 11(7): 1021. doi: 10.3390/cancers11071021

Shimono Y, Zabala M, Cho RW, Lobo N, Dalerba P, Qian D, Diehn M, Liu H, Panula SP, Chiao E, Dirbas FM, Somlo G, Pera RAR, Lao K and Clarke MF, 2009. Downregulation of miRNA-200c Links Breast Cancer Stem Cells with Normal Stem Cells. *Cell*, 138(3), pp. 592-603.

Sin WC and Lim CL, 2017. Breast cancer stem cells—from origins to targeted therapy. *Stem Cell Investigation*, 4: 96. doi: 10.21037/sci.2017.11.03

Sneath RJ and Mangham DC, 1998. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Molecular pathology: MP*, 51(4), pp. 191-200.

Stylianou S, Clarke RB and Brennan K, 2006. Aberrant Activation of Notch Signaling in Human Breast Cancer. *Cancer Res.* 66(3):1517-25. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3054

Suman S, Das TP and Damodaran C, 2013. Silencing NOTCH signaling causes growth arrest in both breast cancer stem cells and breast cancer cells. *British Journal of Cancer*, 109(10), pp. 2587-2596.

Wang Y, Medvid R, Melton C, Jaenisch R and Blelloch R, 2007. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nature Genetics*, 39(3), pp. 380-385.

Yang L, Xie G, Fan Q and Xie J, 2010. Activation of the hedgehog-signaling pathway in human cancer and the clinical implications. *Oncogene*, 29(4), pp. 469-481.

Yi R, Poy MN, Stoffel M and Fuchs E, 2008. A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'. *Nature*, 452(7184), pp. 225-229.

Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP and Pestell RG, 2012. Cancer Stem Cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(12), pp. 2144-2151.

Zhou X, Wang S, Wang Z, Feng X, Liu P, Lv X, Li F, Yu F, Sun Y, Yuan H, Zhu H, Xiong Y, Lei Q and Guan K, 2015. Estrogen regulates Hippo signaling via GPER in breast cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(5), pp. 2123-2135.